

接着細胞型 – セットアップ

これらの手順は全ての細胞に適応されません。

下記にアクセスをお願いします。

www.lonza.com/cellbioinstructions

詳細は個別の手順に従って下さい。

1. フラスコ数を計算して準備します。凍結保存バイアルの正確な細胞数については、試験成績書を参照してください。この計算の調整方法については、377ページ「プラスチック容器における増殖面積」の表を参照してください。

以下の計算方法を使用して容器数を決定し、推奨播種密度として2,500細胞/cm²、3,500細胞/cm²または5,000細胞/cm²を設定します。

$$\frac{\text{細胞数} \times \text{生存率}}{\text{推奨播種密度}} = \text{最大播種面積 (cm}^2\text{)}$$

$$\frac{\text{最大播種面積 (cm}^2\text{)}}{\text{フラスコの増殖面積}} = \text{フラスコ数}$$

例：細胞数520,000で80%の生存率のHMVEC-Lの凍結細胞の場合

$$\frac{520,000 \times 0.80}{5,000} = 83 \text{ cm}^2$$

T-25のフラスコで増殖面積が25 cm²の場合

$$\frac{83 \text{ cm}^2}{25 \text{ cm}^2} = \text{フラスコ3つ}$$

接着細胞型 – 細胞の解凍

推奨された量の培地をフラスコに無菌的に加え、5% CO₂、37°Cの培養器で少なくとも30分間平衡化します。

1. 解凍前にマイクロピペットを準備します。
2. 細胞入りの凍結保存バイアルを取り出します。開封前に、エタノールまたはイソプロパノールで凍結保存バイアルを拭きます。無菌環境内で、キャップを軽く4分の1回転して、内圧を緩和してから再度締め直します。完全には開封しないでください。
3. 凍結保存バイアルを持ち、その下部4分の3を37°Cの水槽に浸して、1~2分間ゆっくりと回しながら内容を解凍します。凍結保存バイアルを注意深く観察してください。最後の氷片が溶けたら取り出します。また容器を完全に水槽に沈めないでください。細胞の解凍時間が2分未満の場合、最適な結果が得られない可能性があります。
4. 凍結保存バイアルを直ぐに取り出し、拭いて乾かします。その後無菌環境に移します。平衡化されたフラスコを準備します。70%のアルコールで凍結保存バイアルを洗浄し、余分なアルコールをふき取ります。
5. 解凍後の凍結保存バイアルの色に注目してください。

25 cm²の実質増殖領域をもつ T-25を使用する場合大きなフラスコとは対照的に、最初の冷凍保存バイアルからこの数のT-25フラスコを用意する利点は、大多数の細胞を失うリスクを軽減することにあります。つまり、最初のT-25フラスコのトリプシン処理に問題が生じた場合には、別のT-25フラスコを使用できるということです。

2. 継代数、細胞型、ロット番号、日付を明記したラベルを各フラスコに貼ります。
3. 無菌環境で添加因子入り増殖培地のボトルを注意深く開封し、フラスコ表面5 cm²毎に1 mlの増殖培地を追加することにより、培地を新しい培養容器に無菌的に移します。

例：25 cm²フラスコに対して5 ml増殖培地

4. 容器の通気口付きキャップを締めます。通気口付きキャップが使用されていない場合、キャップを一旦締めてから約半回転緩めます。培養容器を37°C、5% CO₂存在下で温めて平衡化し、培養器内で少なくとも30分間加湿します。

理想的には、解凍後の凍結保存バイアルの色はピンクとなります。ピンクでない場合は、その色を記録し、播種が成功しない場合は技術サポートに報告してください。

注記：

- 2つ以上の冷凍保存バイアルを解凍する場合、1回に1本の凍結保存バイアルを解凍し、他の凍結保存バイアルは使用準備が整うまで液体窒素内に保管します。
- 凍結保存された細胞は非常に痛みやすくなっています。これらを解凍して復元する場合は可能な限り素早く、最小限の手順で行ってください。
- 凍結細胞を取り扱う際は、保護眼鏡を着用してください。急速な温度変化によって液体窒素が飛び散るおそれがあります。
- 遠心分離を行って凍結細胞から懸濁液細胞を分離しないでください。これを行うと、培養中のDMSO残余による影響よりも重大なダメージが起きます。
- 凍結細胞を直接、ガラススライド、チャンバースライド、グリッドプレートまたはマルチウェルプレート（6、12、24、96…）で解凍することは推奨されません。最適なパフォーマンスを得るには、凍結保存状態からの最初の播種をT-25フラスコに対して行います。詳細な手順については、提供されている細胞培養手順書内のセットアップのセクションに記載された指示に従ってください。細胞特異的なプロトコルについては、技術サポートにお問い合わせください。

接着細胞型 – 播種

内部を指でさわらないようにキャップを取り外す。

- 1,000 μ lのマイクロピペットを800 μ lに設定して使用し、先端を凍結保存バイアルに入れて、優しく、ゆっくりと、一定のリズムでピペットを最大5回上下させながら、細胞を再懸濁します。再懸濁は急いで行わないでください。ピペットの先端をバイアルの下部近くに保ち、気泡の発生を防いでください。
- 〔細胞バイアルの推奨播種密度と数〕〔355ページ参照〕で指定されている通り）細胞を同量ずつ、事前に準備しておいたフラスコに移します。4つのT-25フラスコを準備した場合は、マイクロピペットを250 μ lに設定して移してください。8つのT-25フラスコを準備した場合は、マイクロピペットを125 μ lに設定して移してください。
注記：凍結保存バイアルの全量を1つのT-25フラスコに使用しないでください。
- キャップまたはカバーを取り外し、容器をそっと振り、細胞を均等に分散させます。ガス交換を行う必要がある場合は、キャップを緩めます。
- 培養容器を、5% CO₂の37°Cの培養器に戻します。容器を棚に平らに並べ、接着する細胞の表面積が最大になるようにします。細胞はフラスコ底部に堆積します。

接着細胞型 – 増殖

- 培養細胞を顕微鏡検査し、輸送中の損傷（剥離、ラウンドアップまたは異常な形態）がないかを確認します。相対細胞密度を確認し、コンフルエンスを%で予測します。受領時、培養細胞の密度は30~100%となっているはずですが、いくつかの細胞が剥離している場合がありますが、これは正常です。細胞が大きく損傷を受けているように見える場合は、直ぐに技術サポートに電話でご連絡ください。
- 70%エタノールまたはイソプロパノールで拭き取り、細胞培養フラスコまたはマルチウェルプレートの外部表面を滅菌します。
- 密封したフラスコまたはマルチウェルプレートを37°C、5% CO₂の条件で3~4時間インキュベートし、平衡化します。

播種後

細胞は急速な温度変化や栄養の欠乏した培地に耐性がありません。温めた新鮮な増殖培地で増殖を行うことによって、問題を回避できます（必要な分量だけ温めるようにしてください）。週末や休日の間も、以下に従って細胞の確認と培地追加を行ってください。

- 播種後は2日毎に増殖培地を交換してください（残余DMSOおよび未接着の細胞を取り除くため）。ただし毎日状態をチェックしてください。
注記：培地の交換を行うには、細胞が接着しているフラスコの反対面で滅菌ピペットによる吸入を行い、培地を除去する必要があります。その後、温かい新しい培地を追加します。
- 培養に成功し回収された細胞は以下のようなものと異なります。
 - 透明の非顆粒細胞質をもつ細胞
 - 2日目以降に多数の分裂核
- 細胞がコンフルエントな状態になったら、より多い分量の培地を追加します。ガイドラインとして以下を参照してください。

細胞の状態：	指定の培地分量：
25%コンフルエント未満…	5 cm ² につき1 ml
25~45%コンフルエント…	5 cm ² につき1.5 ml
45%コンフルエント超…	5 cm ² につき2 ml

- 60~90%コンフルエントな状態になるまで細胞への培地追加を続けます。特定の細胞型がコンフルエントになり過ぎた場合（表皮細胞など）、3日以上コンフルエントな状態を保つ場合、不可逆的な接触阻止が発生し、フラスコから剥離する、またはトリプシン処理が難しくなる、あるいはその両方が生じる可能性があります。

- 適量の増殖培地を滅菌容器で37°Cまで温めます。ボトル全体を温めると培地の有効期限が短くなる可能性があります。温流水またはその他温度制御不能な方法で培地を温めないでください。電子レンジは使用しないでください。
- 無菌環境で注意深く細胞培養フラスコまたはマルチウェルプレートを開封し、培地を除去して、温かい、新鮮な培地と交換します。微生物による汚染を防ぐため、容器の首まわりやキャップ内にある培地を無菌的に取り除いてください。
- 通気口のないキャップのついたフラスコを使用している場合は、キャップをゆるめ、フラスコを5% CO₂の37°Cの加湿培養器内に最低24時間置きます。